动 物 学 研 究 1998, 19 (4): 257~262 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

大蹼铃蟾皮肤分泌液中抗菌活性肽的分离纯化及其性质*

赖 仞 叶文娟 冉永禄[1] 吕顺清 杨大同
(中国科学院昆明动物研究所 昆明 650223)

摘 要 通过 Sephadex G-75、G-50 和 G-25 洗脱等步骤，从云南产大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)皮肤分泌液中分离得到了一种有广泛抗菌活性的多肽，被命名为 MSP-Ⅶ。用快原子轰击质谱(f. a. b. m. s)分析其 M+/Z=2648，即此活性肽的分子量为 2647 D。用自动氨基酸分析仪分析，含有 26 个氨基酸。抗菌实验结果表明，此多肽对格兰氏阴性和格兰氏阳性细菌以及真菌都有较强的抗菌活性。溶血实验表明此活性肽有很轻微的溶血活性。此外，MSP-Ⅶ也可以促进平滑肌收缩和增加微血管的渗透性。

关键词 大蹼铃蟾，抗菌皮肤肽，分离纯化，性质
中图分类号 Q959.53

两栖类(尤其是无尾两栖类)皮肤裸露，在长期的自然选择过程中，为抵御有害环境因子的侵袭逐渐形成了一系列保护机制。其中，在它们的皮肤分泌液中含有大量的杀灭微生物、防御天敌的生物胺与活性多肽。其皮肤中生物胺与活性多肽的含量之高是哺乳动物无可比拟的，因而被称为生物胺与活性多肽的巨大储存库。自 Anastasi 等(1971)首次从欧洲铃蟾(*Bombina bombina*)皮肤中提取出一种 14 肽(称之为铃蟾肽，bombesin)以来，已从世界上 600 多种两栖类皮肤中提取出 100 多种活性肽。例如，产婆蟾肽(alytesin)、细趾蛙肽(litorin)、雨蛙肽(caerulin)、爪蛙肽(xenopsin)等(Charles, 1990)。两栖类皮肤活性肽具有广泛的生理和药理活性，按其活性特点可分为：速激样多肽(physalaemin-like peptides or tachkinin)、舒缓激肽样多肽(bradykinin-like peptides)、雨蛙肽样多肽(caerulein-like peptides)、铃蟾样肽(bombesin-like peptides)以及蛙啡肽类等 14 类多肽家族(Roseghini, 1988, 1989)。对两栖类皮肤活性多肽的研究主要集中于美洲、澳洲、非洲和欧洲(Roseghini, 1988, 1989)。许多两栖类皮肤活性肽具有广泛的抗菌活性。

全世界已知的铃蟾共有 7 种，其中大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)主要分布于中国西南部地区，云南山区种群数量很大。其皮肤腺发达，受到刺激时便大量分泌含活性物质的皮肤粘液。对大蹼铃蟾皮肤分泌物中活性成分的分离与生理生化性质的研究工作，国内外尚未见报道。本文报道了云南产大蹼铃蟾皮肤分泌液中抗菌活性肽的分离纯化和性质。

---

* 云南省应用基础研究基金资助项目
[1] 通讯联系人
本文 1997-10-24 收到，1998-03-30 修回

1 材料和方法

1.1 材料

实验用大蹼铃蟾从云南野外采集并于室内饲养；实验用昆明系小白鼠购自本所实验动物养殖中心。Sephadex G-25、G-50、G-75为瑞典Phamacia产品；TEMED、丙烯酰胺、β-巯基乙醇、考马斯亮兰R-250为瑞士Fluka产品；其他试剂为国产分析纯。质谱仪为Autospec-3000，氨基酸自动分析仪为HITACHI 835-50。

抗菌实验菌株为：枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus auneus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、肺炎球菌(*Klebsiella pneumoniae*)、冻土元霉(*Mucor liemalis*)、微小毛霉(*Mucor pusillus*)、青霉(*Penicillium* sp.)、黄曲霉(*Aspergillus flavus* sp.)、啤酒酵母(*Sacharomyces cerervisiae*)等。

1.2 方法

1.2.1 MSP-Ⅶ的提取分离 参照Anastasi等(1971)的方法并作了重大改进。采用刺激的方法从活体蟾蜍获得皮肤分泌液，过滤以除去不溶物，冻干保存。Sephadex G-25、G-50、G-75用蒸馏水溶胀，经碱处理并用0.5%的甲醇溶液浸泡2 h。首先，分泌液冻干粉以0.5%的甲醇溶液作为洗脱液，用Sephadex G-75层析柱(2 cm × 120 cm)分离，用LKB自动部分收集器收集，流速为1滴／4 s，每10 min 1管，在280 nm测定紫外吸收值，收集小分子洗脱峰Ⅲ。Sephadex G-25，G-50分别装入层析柱(2 cm × 120 cm)，然后将两根柱连接起来，并注意使两柱接头处保持最小的柱外体积，以0.5%的甲醇溶液平衡。取Sephadex G-75峰Ⅲ成分上柱，以0.5%的甲醇溶液洗脱，用LKB自动部分收集器进行收集，流速为1滴／4 s，每10 min一管，在280 nm测定紫外吸收值，收集第Ⅶ洗脱峰。

1.2.2 纯度、分子量测定 用高效液相色谱(HPLC)进行纯度测定，注射100 μL MSPⅦ的蒸馏水溶液(浓度为0.3 mg／mL)于Nava-Pak C18反相柱，按下列方式进行梯度洗脱。A流动相(0.1%三氟乙酸水溶液)，B流动相(0.1%三氟乙酸水溶液与80%乙腈水溶液等体积混合，梯度洗脱)，220 nm监测紫外吸收值。分子量测定采用快原子轰击质谱法(fast atom bombardment mass spectrometry，f. a. b. m. s) (Maria，1987)。以甘油：间硝基苄醇：二甲亚砜(1∶1∶1，v∶v∶v)为底物，以Cs+作为轰击粒子，电流为1 μA，发射电压25 kV。

1.2.3 氨基酸组成测定 取一定量的样品经盐酸水解后，用HITACHI 835-50氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成。

1.2.4 溶血活性检测 用氰高铁血红蛋白法(上海医学化验所，1979)测定溶血活性。

1.2.5 平滑肌收缩活性的检测 采用离体兔主动脉条实验法(徐叔云，1985)。

1.2.6 对微血管通透性的影响 采用伊文氏蓝染料法(田牛，1987)。取伊文氏蓝染料和甲酰胺配成不同浓度的溶液制作标准曲线。伊文氏蓝染料和生理盐水配成1.5%溶液，小白鼠(对照组和给药组各5只)尾静脉注入伊文氏蓝溶液0.1 mL／只(给药组的伊文氏蓝溶液中含有1 mg／mL的MSP-Ⅶ)，注药后2.5 h将动物处死，取大脑、小脑、肝脏、小肠、肺分别称量。然后将组织分别放入已加入5 mL甲酰胺溶液的试管中，在54℃恒温水浴锅内保持24 h，让组织中的伊文氏蓝溶解在甲酰胺溶液中，将甲酰胺溶液过滤后用分光光度计于620 nm处测定吸光度。按标准曲线确定伊文氏蓝的浓度，最后以每克组织中所含染料的微克

数表示。

1.2.7　抗菌活性检测　采用杯碟法(徐叔云，1985)。真菌培养基为改良沙保氏(Sabousand)培养基，细菌培养基为普通琼脂培养基。分别注入加热融化的培养基 20 mL 于平皿中作为底层，使其在皿底内均匀摊布，凝固后，另取培养基适量加热融化后，分别在每皿中加入 5 mL 菌悬液，摇匀，使其在底层上均匀摊布，作为菌层。冷却后，在平皿中等距离均匀放入已消毒的不锈钢杯 6 个。第 1 个钢杯加入 0.3 mg／mL 浓度的 MSP-Ⅶ溶液 0.1 mL，其余钢杯采用二倍稀释法加入样品液，37℃培养，观察抑菌圈大小。抑菌圈 10 mm 以上的作为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration，MIC)。

2　结果与讨论

2.1　大蹼铃蟾皮肤分泌液的分离纯化

层析图谱见图 1 和图 2。收集图 1 中的峰Ⅲ，冻干，再经 G-25+G-50 层析而获得图 2 的层析图谱。图 2 中峰Ⅶ被命名为 MSP-Ⅶ。

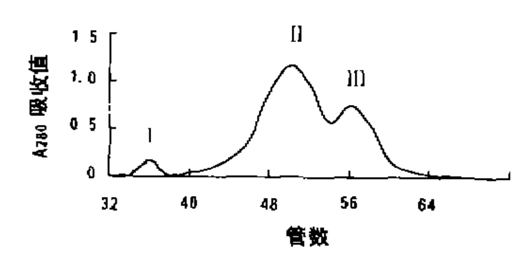


图 1　Sephadex G-75 凝胶过滤
Fig. 1　Gel filtration on sephadex G-75

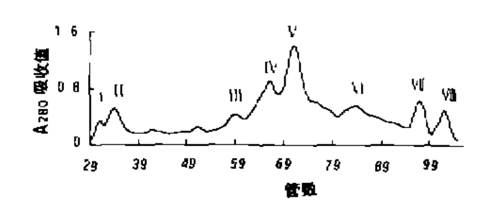


图 2　Sephadex G-25+G-50 凝胶过滤
Fig. 2　Gel filtration on sephadex G-25+G-50

2.2　MSP-Ⅶ的纯度、分子量和氨基酸组成测定

由图 3 MSP-Ⅶ的反相 HPLC 层析图谱可以看出，MSP-Ⅶ在 11.308 min 出峰，其洗脱模型基本呈单一对称峰。用快原子轰击质谱法测定 m+／z＝2648，即分子量为 2647 D。其氨基酸组成结果见表 1。

2.3　溶血活性检测

MSP-Ⅶ的溶血活性检测，每组实验重复 3 次，取平均值，结果见表 2。由结果可以看出，MSP-Ⅶ有一定的溶血活性，但并不是很强。

2.4　MSP-Ⅶ对兔主动脉平滑肌收缩的影响

结果见图 4。从图 4 可以看出，MSP-Ⅶ促进兔主动脉平滑肌的收缩。

2.5　MSP-Ⅶ对微血管通透性的影响

每组实验进行 5 次，取平均值，结果见表 3。由结果可以看出，MSP-Ⅶ对肺组织的影响最大，其次是小肠和肝，而大脑和小脑的影响较小。

2.6　MSP-Ⅶ的抗菌活性检测

每个平板的第 1 个钢杯加入 0.3 mg／mL 浓度的 MSP-Ⅶ溶液 0.1 mL，其余钢杯采用二倍稀释法加入样品液，每组实验进行 3 次，结果见表 4。MSP-Ⅶ对格兰氏阴性，格兰氏阳性细菌和真菌以及酵母菌都有较强的抗菌活性。

图 3 MSP-Ⅶ的反相 HPLC 层析图谱
Fig. 3 RP-HPLC chromatography of MSP-Ⅶ

表 1 MSP-Ⅶ的氨基酸组成和分子量
Table 1 Amino acid composition and molecular weight of MSP-Ⅶ

氨基酸	残基数
Asx	2
Glx	4
Gly	6
Ala	2
Val	2
Ile	2
Leu	4
Lys	4
Trp	未测
总残基数	26
氨基酸分析分子量	2630±3
质谱分析 M+/Z	2648

注: Asx 和 Glx 可能是 Asn 或 Asp 和 Gln 或 Glu (Asx and Glxmay be Asn or Asp and Gln or Gln)。

表 2 MSP-Ⅶ的溶血活性
Table 2 Hemolytic activity of MSP-Ⅶ

浓度/μg·mL^{-1}	红细胞溶解百分数/%	
	粗样品	MSP-Ⅶ
0.0	0.00	0.00
0.2	0.11±0.02	1.50±0.03
1.0	0.27±0.01	2.70±0.04
10.0	1.31±0.02	5.71±0.05
100.0	2.42±0.02	7.27 ±0.03

表 4 MSP-Ⅶ的抗菌活性检测
Table 4 Anti-microbial activity of MSP-Ⅶ against various bacteria and fungi

微生物	MIC/μg·mL^{-1}	
	粗样品	MSP-Ⅶ
枯草杆菌	75	18.75
金黄色葡萄糖球菌	75	18.75
大肠杆菌	150	18.75
绿脓杆菌	75	37.5
巨大芽孢杆菌	150	37.5
白色念珠菌	>300	150
肺炎球菌	150	18.75
冻土毛霉	>300	75
微小毛霉	>300	75
青霉	300	75
黄曲霉	>300	150
啤酒酵母	150	37.5

表 3 MSP-Ⅶ对微血管通透性的影响
Table 3 The effect of MSP-Ⅶ on permeability of micro-vessels

组织	单位组织的染料渗出量/μg·g^{-1}(组织)	
	对照	MSP-Ⅶ
大脑	1.75±0.05	2.31±0.04
小脑	1.15±0.03	2.32±0.06
肝	1.34±0.03	2.87±0.07
小肠	2.53±0.01	6.18±0.05
肺	4.51±0.06	10.41±0.06

从以上的一些实验结果得知，MSP-Ⅶ这类从大蹼铃蟾皮肤分泌液中分离出的小分子多肽具有较多和较强的生理和药理活性，尤其是对微血管通透性的影响和它的抗生作用特别显著。MSP-Ⅶ无论是对格兰氏阴性、格兰氏阳性细菌、真菌以及酵母菌都有较强的抗菌活性。国外对于两栖类皮肤抗菌活性肽有较多的研究，目前为止已从两栖类的皮肤中获

得 30 多种抗菌活性肽。Andreu 等(1985)对两栖类的皮肤抗菌肽的研究表明，大多数的两栖类皮肤抗菌肽有形成双亲 α-螺旋的倾向，且它们基本上都是碱性多肽，易于与酸性的生物膜脂双分子层相结合。两栖类皮肤抗菌活性肽的这些结构特点，使之容易形成跨膜通道，介导一系列的生物效应。Hans 等(1989)的研究表明，两栖类皮肤活性肽的抗菌活性主要是由于其依靠双亲 α-螺旋的结构特点形成跨膜的离子通道，使微生物不能形成跨膜电势差，造成氧化磷酸化去偶联。MSP-Ⅶ通过碱性电泳检测，也显示出较强的碱性，此皮肤肽也可能是一个碱性肽，且其氨基酸组成的 α-螺旋倾向参数(α-helix propensities parameter, Pα)的平均值大于 1。从 MSP-Ⅶ的这些结构特点，可以推测它也可能形成双亲 α-螺旋的跨膜离子通道，从而影响微生物的代谢和生长。有关 MSP-Ⅶ的结构和功能方面的进一步研究还在继续进行。

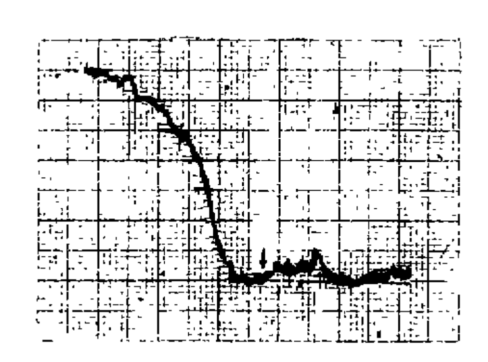


图 4　MSP-Ⅶ的兔主动脉平滑肌收缩活性检测
Fig. 4　The effect of MSP-Ⅶ on the aorta smooth muscle
↓为加 MSP-Ⅶ (administering MSP-Ⅶ)。

致谢　对中国科学院昆明动物研究所李朝翠、刘万兆、饶定齐老师在兔主动脉平滑肌收缩活性检测实验和取材等方面的帮助；孟庆雄、吕秋敏同志在试验过程中的帮助；中国科学院昆明植物研究所梁慧玲老师在质谱测定和解谱过程中的大力帮助；云南大学微生物研究所田永强和廖昌珑同志在抗菌活性检测实验中的大力支持，谨致谢忱。

参 考 文 献

上海市医学化验所，1979. 临床生化检验. 上海：上海科学技术出版社. 121

田　牛，1987. 微循环方法学 北京：原子能出版社. 37.

徐叔云，1985. 药理实验方法学. 北京：人民卫生出版社. 561，1063.

Anastasi A, Erspamer V, Bucci M, 1971. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogues active peptides. *Experientia*, **27**: 166-167.

Andreu D, Aschauer H, Kreil G *et al*, 1985. Solid-phase synthesis of PYLa and isolation of its natural counterpart, PGLa [PYLa-(4-24)], from skin secretion of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Biochem.*, **149**: 531-535.

Charles L B, Michael Z, 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**: 395-414.

Hans V, Westerhoff, Davor J *et al*, 1989. Magainins and the disruption of membrane-linked free energy transduction. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.*, **86**: 6597-6601.

Maria G, Linda P, Bradford W *et al*, 1987. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.*, **243**: 113-120.

Roseghini M, Erspamer G F, Servenni C *et al*, 1988. Biogenic amines and active peptides in the skin of fifty-two African amphibian species other than bufonids. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91C**(2): 281-286.

Roseghini M, Erspamer G F, Serverini C *et al*, 1989. Biogenic amines and active peptides in extracts of the skin of thirty-two European amphibian species *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**(2): 455-460.

ANTI–MICROBIAL PEPTIDE FROM THE SKIN SECRETION OF *Bombina maxima*

LAI Ren YE Wen–juan RAN Yong–lu LU Shun–qing YANG Da–tong

(*Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

An anti–microbial peptide named MSP–Ⅶ, was isolated from the skin secretion of the toad, *Bombina maxima*, distributed in Yunnan Province of China, by a three step protocol including Sephadex G–75 and G–50 connected with G–25 two steps of the gel filtration and one reverse–phase high–performance liquid chromatography. Fast atom bombardment mass–spectroscopy of MSP–Ⅶ gave a protonated molecular ion m / z 2648 which matched the theoretical molecular weight predicted from the composition of amino acids. It consists of twenty–six amino acid residues determined by automatic amino acid analyzer. MSP–Ⅶ is a water–soluble peptide. MSP–Ⅶ has a strong anti–microbial activity to bacteria, fungi and yeast with a little hemolysis activity. These characterizations of MSP–Ⅶ make it possible to be used as a clinical anti–microbial medicine. We tested its effect on micro–vessel osmosis ability with Evens blue dye. It was found that MSP–Ⅶ made the permeability of some tissues such as lung, liver, small intestine, to Evens blue dye increase. In particular, this peptide obviously increased permeability of lung. In addition, MSP–Ⅶ displayed an effect on the contraction of smooth muscle, which strengthened the contraction ability of rabbit aorta smooth muscle.

Key words *Bombina maxima*, Anti–microbial skin peptide, Purification, Characterization